

熱 レ ン ズ 顕 微 鏡



新しいレーザー分析顕微鏡である熱レンズ顕微鏡について解説した。熱レンズ分光法はよく知られているが、顕微鏡下で実現した例はあまりない。まず技術的な背景について解説し、次に応用例について紹介する。最も大きな特長は、レーザー顕微鏡に匹敵する感度を有しながら吸光分析法と同等の広い適用範囲を持つことである。生体微小組織や単一細胞内の超高感度分光分布測定などを紹介し、液相単一分子検出の可能性などについて展望する。

北 森 武 彦

1 はじめに

顕微鏡は元々微小物体の形状を観察するものであるが、形状に加えて組成や濃度、状態などの物質情報や化学情報を得ることができる顕微鏡は分析顕微鏡と呼ばれ、限られた微小部分や局所の分析を顕微分析という。試料全体の組成や平均濃度を決める通常の分析法とともに、顕微分析も半導体、生体、機能材料など先端科学技術の研究開発、製造現場で広く利用されるようになり、分析顕微鏡は近年ますます重要になりつつある。走査トンネル顕微鏡 (STM) や原子間力顕微鏡 (AFM)、走査近接場光学顕微鏡 (SNOM) を代表とする走査プローブ顕微鏡、従来の走査電子顕微鏡 (SEM) やトンネル電子顕微鏡 (TEM) 及びそれらに X 線分析機能を付加した X 線マイクロアナライザー (XMA) などの電子顕微鏡系の局所分析装置、X 線光電子分光 (XPS) やオージェ電子分光、マイクロ二次イオン質量分析 (SIMS) などの電子・イオンマイクロビーム系の表面分析装置、共焦点レーザー顕微鏡と蛍光分析やラマン分光測定機能を持つレーザー顕微鏡、顕微 FT-IR などの顕微赤外分光装置など、原子・分子サイズからミクロンサイズ、X 線領域から赤外線領域と、非常に多岐にわたる分析顕微鏡や顕微分析装置が実用に供されている。最近ではシンクロトロン放射光を利用した X 線顕微鏡も実現されつつある。しかし、真空が不要で、非接触・非破壊で分光測定できる光学領域の分析顕微鏡は意外に欠落しており、主としてレーザー蛍光顕微鏡が使われて

いるにすぎない。溶液あるいは組織中で *in-situ*・*in-vivo* 測定することが重要な生体試料を扱う分野では光学顕微鏡は日常的に扱われているが、なお分析機能を持つ顕微鏡の開発が望まれている。こうした背景のもとに、筆者らは蛍光分子以外にも広く利用できる、光熱変換効果を利用した熱レンズ顕微鏡を創案し実現してきた。本稿では、熱レンズ顕微鏡の原理と装置や応用例を紹介し、分析顕微鏡だけでなく微小空間化学の分光測定法としての将来を展望したい。

2 熱レンズ顕微鏡の原理と装置

原理的には光学顕微鏡でも蛍光、ラマン、吸光など分光情報を得ることはできる。しかし、多くの場合、試料は光透過性の切片であり、ランペルト・ベール則に基づく吸光測定できるほど光路長は十分にとれない。光学的な分析顕微鏡が蛍光分析に限られる理由はここにあり、蛍光顕微鏡ではレーザー光やキセノンランプの輝線など高輝度光束を励起光に用いて感度を確保する。もし光学的な顕微分析を蛍光分子以外の対象にも広げられれば、蛍光標識のほかに酵素や銀染色など現在使われている非常に多くの標識にも分析対象を広げられる。究極的には無標識で形状とともに分子分布像を得ることも期待されるし、静止画像だけでなく動的挙動も追跡できるようになるだろう。

光分析に使われる分子過程では蛍光過程の対極に光熱変換過程があり、無輻射緩和収率が多くの分子で 1 に近いので、光熱変換分光法はほぼ吸光分析法と同等に扱える¹⁾。励起光をレンズで絞り込んで微小部を光熱変換測定する顕微光熱変換分光法も研究されている。しか

Thermal Lens Microscope.

し、顕微鏡下で更に光を絞り込み、空間分解能で光熱変換分光法を達成した例はなかった。これは、顕微鏡下では試料と対物レンズとの間げきはわずかで、ここにプローブ光などを通して光偏向測定することは至難の業であることや、検出素子である圧電素子などを試料にはり付けることはカバーガラス下の液体中の微小試料を測定することには向かないなどの理由によるためである。こう考えていくと、数多くの光熱変換効果のうち、顕微鏡下で直接測定できる可能性のあるのは熱レンズ効果に限られてくる。

熱レンズ効果や熱レンズ分光法はよく知られているので、測定原理の詳細については他の解説などに譲り¹⁾、ここでは割愛させていただく。仮に顕微鏡下で熱レンズ分光測定をしようとする場合、図1のような光学配置が想定される²⁾。顕微鏡下で励起光を微小領域に絞り込み光熱変換効果を誘起すれば、光強度は光軸上が最も強く周辺に行くほど弱くなるので（厳密に言えば焦点では収束する前の強度分布のフーリエ変換となる）、この励起光の強度分布に沿って温度分布が生じる。液体の屈折率はほとんどの場合温度に反比例するから、屈折率分布は反対に光軸付近が低くなる。光学的にはこの分布はちょうど凹レンズと同じ効果を持つので、この効果を熱レンズ効果と呼び、効果の大きさ、すなわちレンズの度数は試料の吸光度に比例する。ここまでの説明では普通の熱レンズ効果となんら変わることはなく、顕微鏡下でも熱レンズ分光法は簡単に実現でき、かつ光熱偏向法を顕微鏡下で利用しようとする際に問題となるプローブ光の入射に関する困難も解決されているように思われる。

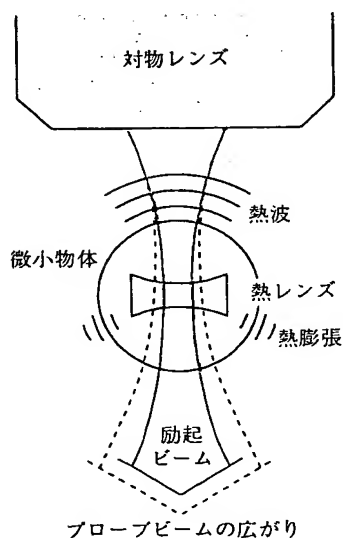


図1 顕微鏡下の熱レンズ測定¹⁾

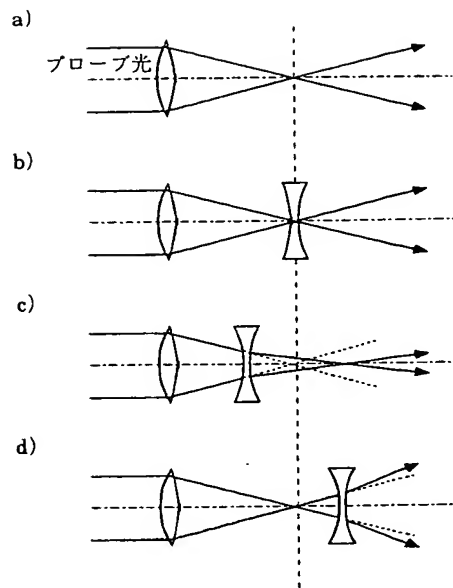


図2 熱レンズ測定を想定した場合に対応する幾何光学配置

しかし、熱レンズ効果はそう簡単には顕微鏡下では実現できない。

図2に熱レンズ測定を想定した場合に対応した幾何光学配置の簡単な例を示した。図2, a)は熱レンズに相当する凹レンズはなく、単純に対物レンズの凸レンズでプローブ光を絞り込んだ場合に相当する。次に図2, b)はプローブ光の焦点に熱レンズに対応する凹レンズが生成した場合であるが、簡単な幾何光学から、焦点に凹レンズがあってもプローブ光は何事もなかったように通過する。もちろん厳密な波動光学からは若干異なった様相を呈するが、巨視的にはおおむねこの理解で良い。一方、凹レンズが凸レンズの焦点を外れて位置する場合（図2, c) と d)）は、プローブ光の光線軌跡は明らかに凹レンズの影響を受け、図2, a)の場合と異なる軌跡を通る。つまり、プローブ光の軌跡から熱レンズ効果を検出できることになる。この説明から明らかなように、熱レンズの位置とプローブ光の焦点位置が異なることが、熱レンズ効果を検出する上で必須の条件となる。空間的に均一な試料中では、熱レンズ効果は励起光の焦点位置に生成すると考えて良いので、励起光とプローブ光の焦点位置は空間的に離れている必要があり、熱レンズ効果を光学的に最も強く検出する理論的な最適距離は共焦点長となる。このことが顕微鏡下の熱レンズ測定を困難にしている。というのは収差によるビントのぼけをいかに補正するかが、カメラや光学顕微鏡をはじめ一般光学機器メーカーの技術力を示す指標であるが、現代の光学機器では可視域における色収差はほとんど完璧に補正

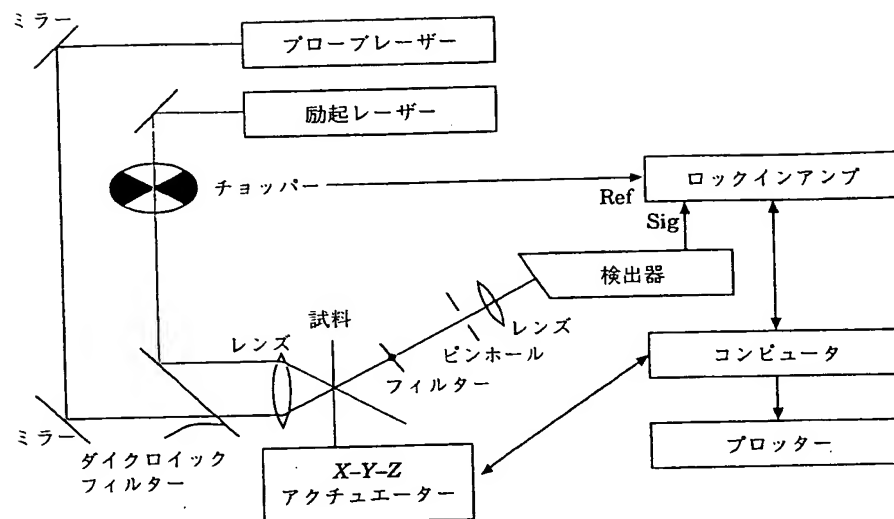


図3 クロスビーム方式による熱レンズ測定装置の構成³⁾

されている。つまり、光学顕微鏡やその対物レンズを熱レンズ測定に使おうとしても、色収差は補正されているために、励起光とプローブ光の焦点位置は一致してしまい、図2, b) の状況となるので熱レンズ測定は原理的にできないことになる。この光学上の難しさが、四半世紀に及ぶ比較的長い熱レンズ分光法の歴史の中で顕微測定が実現されなかった理由ではないかと推測している。

このような測定上の原理的困難さを回避するために幾つかの方式が提案されている。まず、プローブ光を光軸から軸外しすること、次に焦点は同一でも熱レンズの発生位置を励起光の焦点位置から外すこと、そして最後に光学系をうまく利用して二つの焦点位置を最適位置にずらすことが考えられる。第一のプローブ光を熱レンズの光軸に対して軸外しする方式は、Dovichらにより試みられた。図3のように励起光とプローブ光を対物レンズの光軸に平行に入射する。この配置では励起光とプローブ光は収束しながら焦点で交差するので、彼らはこの方式をクロスビーム (cross beam) 方式と呼んでいる。励起光で誘起した屈折率分布の等高線に対してプローブ光は斜めに入射されることになるので、この方式は熱レンズ測定というよりむしろ光熱偏向測定に近い。この方式は古くから知られていたが、顕微鏡レンズを使った例としては彼らが最初である。手軽に実現できるが、プローブ光に対して熱レンズ効果と光熱変換効果が混合して起こるので、理論的取り扱いが複雑で感度要因や信号生成領域を評価することは難しい。第二の熱レンズの生成する位置をプローブ光の焦点から外す方式は、固体表面に薄膜状に存在する試料を測る場合に簡単に実現できる。図4のように熱レンズは試料の位置に生成するの

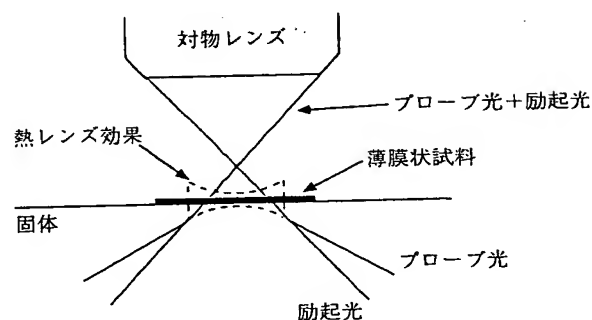


図4 表面熱レンズ効果測定的光学配置

で、固体表面から焦点を外しておけば図2, d) の光学配置を実現することができる。この方式は表面熱レンズ法 (surface thermal lens method) と呼ばれ、固体表面の試料分布測定に利用されている。第三の方式はとにかく励起光とプローブ光の焦点を同軸上でずらせば良いので、色収差を持ったレンズを使うことや、励起光とプローブ光のいずれかのレーザー光を平行光とせず、ビームエキスパンダー等で角度を持たせて対物レンズに入射することで実現できる。これは筆者らの方式で、真正の熱レンズ測定を顕微鏡下で実現することができる。以上のように、顕微鏡下で熱レンズ測定するには、いずれにしても通常の熱レンズ測定法に対して一工夫する必要がある。

3 熱レンズ顕微鏡の特性

熱レンズ顕微鏡の性能を他の分析顕微鏡と比較してみる。まず空間分解能であるが、これはプローブ光のスポットサイズで決まる。焦点における波長 λ のレーザ

一光のスポット径は λ/NA (NA は収束凸レンズの開口数) で評価でき、一般にプローブ光の波長は励起光の波長より長く設定するので、励起光スポットはプローブ光スポットの内側に入る。光熱変換効果で発生する熱は熱拡散で広がるが、プローブ光が通過する領域はその内側になるので、空間分解能は熱拡散に支配されなくなる。このことは先の Dovichi らのクロスビーム方式で最初に示され、熱レンズ測定に一般に成立する。従って、光熱変換効果を使った顕微測定では空間分解能は熱拡散長で決まるが、熱レンズ顕微鏡では上記のどの方式を用いても空間分解能は熱拡散長ではなくプローブ光のスポット径に支配される。熱拡散長は試料の熱物性と光変調周波数 f で決まり、 $f=1\text{ kHz}$ ではオーダーとしておよそ 10^0 から $10^1\text{ }\mu\text{m}$ 程度であり、 $f^{-1/2}$ に比例する。信号強度の関係から f を 10 kHz 以上に設定することは難しいので、一般の光熱変換顕微測定の空間分解能はおおよそこの程度と考えて良い。従って、熱レンズ顕微鏡は光熱変換顕微測定の中では最も優れた空間分解能を示し、レーザー蛍光顕微鏡とも同等と考えて良い。一例として銀の薄膜を蒸着したガラスプレートで空間分解能を評価した例を図5に示す。図5から明らかなように、おおよそスポットサイズ $1.0\text{ }\mu\text{m}$ で薄膜端点の信号が立ち上がっており、2点分解を基準とした空間分解能がスポットサイズ程度であることが分かる。ちなみに2点分解ではなく信号の立ち上がりだけからは $0.3\text{ }\mu\text{m}$ 程度の銀微粒子でも検出できている。但し、この場合スポット内に二つの微粒子が存在しても識別できないので、空間分解能はスポットサイズ程度と評価するのが妥当である。いずれにしても熱レンズ顕微鏡は表面上の微粒子検出に優れた能力を持つことが分かる。

検出限界は通常の熱レンズ分光法と同程度で、吸光度にして 10^{-7} ~ 10^{-8} 程度に達する。 10^{-9} まで測定できるとした報告もある³⁾。モル吸光係数が $10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$

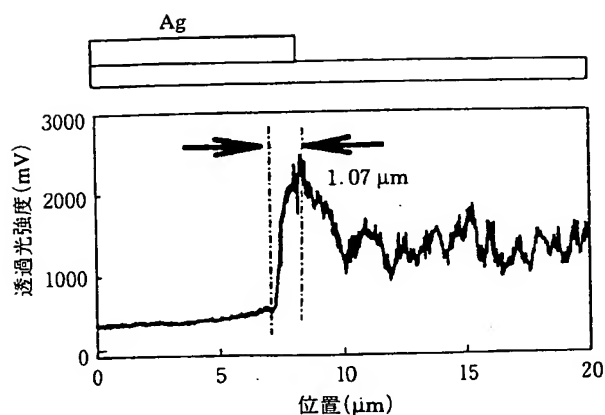


図5 ガラス板上の銀蒸着膜を一次元走査しながら顕微熱レンズ測定した例⁵⁾

程度の色素であれば zmol (10^{-21} mol)/スポット ~ サブ amol /スポットの感度が得られ、検出感度としても一般の共焦点レーザー蛍光顕微鏡に匹敵し、デンストメトリ型の顕微吸光測定法に比較して4けた以上優れる。

最後に種々の光学分析顕微鏡の特性を表1にまとめた。表1から、特定の吸収波長を持つ物質の分布など、分光情報を得る目的では、熱レンズ顕微鏡は適用範囲も広く優れた特性を持つことが分かる。

4 熱レンズ顕微鏡の応用

4.1 画像化

分析顕微鏡で最も重要な応用は、形状とともに化学情報を画像化することにある。例えば、染色標本の染色部を吸光度の関数として画像化すれば、染色部位の像が得られる。図6に Ziehl-Neelsen 染色したマイコバクテリア結核に感染した表皮組織をクロスビーム法で画像化した例を示す。画像化範囲は図の左から a) 2 mm , b) $100\text{ }\mu\text{m}$, c) $10\text{ }\mu\text{m}$ である。空間分解能はそれぞれ $20\text{ }\mu\text{m}$, $10\text{ }\mu\text{m}$, $1\text{ }\mu\text{m}$ である。

表1 種々の光学分析顕微鏡の比較

顕微鏡の種類	分解能	検出限界 (感度)	<i>in-situ</i> <i>in-vivo</i>	適用性	定量性	透明試料
熱レンズ顕微鏡	$0.4\text{ }\mu\text{m}$ ^{a)}	1分子	○	○	○	△
光音響顕微鏡	$1\text{ }\mu\text{m}$	$0.1\text{ }\mu\text{m}$	○	○	○	○
光学顕微鏡	$0.5\text{ }\mu\text{m}$ ^{b)}	$0.5\text{ }\mu\text{m}$	○	○	×	○
吸光顕微鏡	$0.5\text{ }\mu\text{m}$ ^{b)}	$0.5\text{ }\mu\text{m}$	○	○	△	×
共焦点レーザー顕微鏡	$0.25\text{ }\mu\text{m}$	$0.25\text{ }\mu\text{m}$	○	△	×	○
レーザー蛍光顕微鏡	$0.4\text{ }\mu\text{m}$ ^{a)}	1分子	○	×	△	○
暗視野顕微鏡	$0.01\text{ }\mu\text{m}$	$0.01\text{ }\mu\text{m}$	○	△	×	×
走査近接場顕微鏡	$(\leq 0.01\text{ }\mu\text{m})$	1分子	△	○	○	×

a) $NA=1.4$ b) アップの回折限界

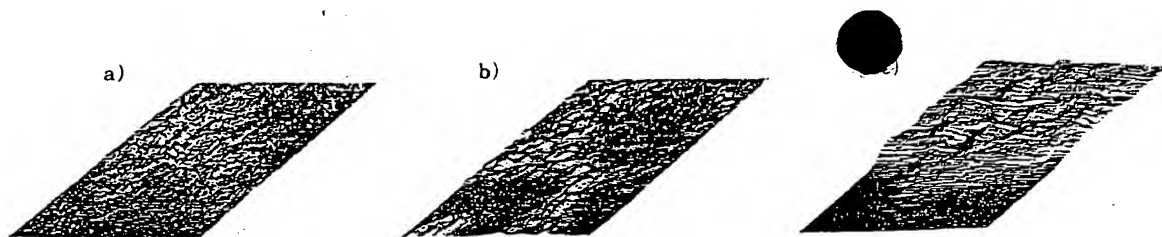


図6 マイコバクテリア結核に感染した表皮組織の熱レンズ顕微鏡像³⁾

1, 0.1 μm と報告されているが、上述の2点分解能という点では1 μm 程度と考えたほうが良さそうである。画像はやや鮮明さを欠いているが、b) と c) では平均長さ3 μm 程度のバクテリアが画像化できていると報告されている。形状だけを画像化する通常の顕微鏡像では信用できないが、Ziehl-Neelsen 染色の吸収バンドに合わせた、波長442 nmのHe-Cd レーザー光を励起光として用いているので、熱レンズ像として確かに染色の濃淡を画像化していると考えられ、染色法の確かさから不鮮明であるにせよバクテリアの画像をとらえていると判断して良いであろう。

4.2 濃度分布測定

熱レンズ信号が吸光度に比例することを利用すれば、形状にとらわれることなく特定の物質の濃度分布を定量的に画像化することができる。化学情報の画像化という点では最も重要な情報の一つである。図7にトブラマイシンという抗生物質が尿細管の組織内に取り込まれていく過程を、反射型共焦点レーザー顕微鏡と熱レンズ顕微鏡で定量測定した例を示す。金コロイドで標識した抗体を用いてトブラマイシンを免疫染色した。通常は酵素標識で免疫染色することが一般的である。酵素反応のターンオーバー数(繰返し数)を稼げば目視できるほどよく染色されるからである。しかし、酵素反応のターンオーバー数をすべての標識酵素に対して一定に保つのは難しく、半定量的な染色方法として認知されている。定量的な染色には標識と分析対象分子が1:1の関係を保持することが最良であるが、この場合、酵素反応のような増幅作用がないので目視できるほどの染色は得られない。そこで筆者らは熱レンズ顕微鏡と金コロイド標識を用いて、酵素反応や銀染色のような化学的増幅なしにトブラマイシンの組織内濃度分布を画像化した。図の左側に反射型共焦点レーザー顕微鏡像を示す。尿細管組織の断面と金コロイド超微粒子が画像化されている様子が分かる。図の右側は同じ部位の熱レンズ像で、励起光は金コロイド超微粒子のプラズモン吸収バンド517 nmによく一致する514.5 nmのAr レーザー光を用いた。トブ

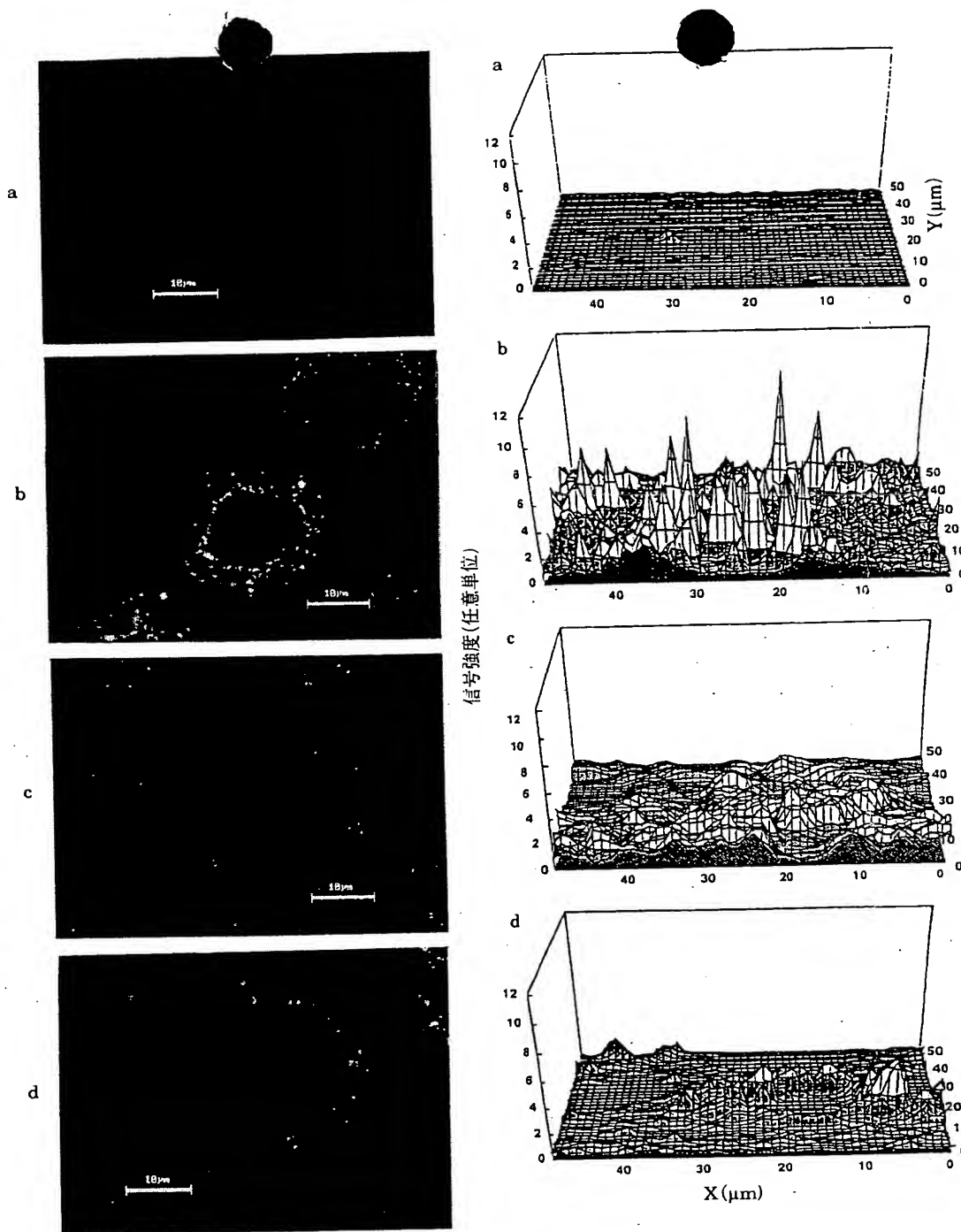
ラマイシンに対する良好な検量線も得られており、熱レンズ像はトブラマイシンの分布を定量的に画像化できていると報告されている。図7のb), c), d) はそれぞれトブラマイシンを摂取してから1, 4, 8時間後の画像で、検量線との対比から組織内には約10, 5, 1 fmolのトブラマイシンが存在していると推定される。また、時間がたつにつれて、トブラマイシンが尿細管組織から排出されていく様子も知ることができる。

図7の共焦点レーザー顕微鏡像と熱レンズ顕微鏡像を比較すると、共焦点レーザー顕微鏡の画像では標識金コロイドに対応すると考えられる輝点が離散的に見えるのに対して、熱レンズ顕微鏡像ではなめらかな分布像が得られている。代謝過程や組織構造から考えてトブラマイシンが離散的に分布するとは考えにくく、熱レンズ顕微鏡像のほうがより正確かつ定量的に分布像を示していると考えられる。標識金コロイド超微粒子は40 nmの大きさであるため、画像化されている輝点は金コロイド超微粒子の凝集体と考えられる。

このように、熱レンズ顕微鏡は分析顕微鏡として特定の化学種の分布像を定量的に与える。この場合の検出限界は10 zmol/スポットと報告されている。

4.3 細胞内の定量分析

これまでは熱レンズ顕微鏡による固体試料表面の画像化について述べてきたが、顕微鏡下の微小空間で熱レンズ効果を誘起できるので、熱レンズ顕微鏡は本質的に液体試料の定量分析に利用できる。例えば細胞内部に励起光とプローブ光を絞り込めば、細胞内化学種の定量分析が可能となる。図8にスライドガラスとカバーガラスの間げきに培養液ごと滴下した、マウスハイブリドーマ(培養細胞)の熱レンズ測定を簡単に示した。培養細胞を様々な濃度のトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)溶液に浸してTNBSを細胞内に取り込ませ、熱レンズ顕微鏡で細胞内のTNBSを定量した結果を図9に示す。測定は単一細胞で行われたが、同一濃度のTNBS溶液中の細胞から複数の細胞を選択して測定し、熱レンズ信号の平均値とばらつきをそれぞれ黒丸とエラーバーで示



左列は反射型共焦点レーザー顕微鏡像，右列が熱レンズ顕微鏡像

図7 金コロイド免疫染色した尿細管組織中のトブラマイシン分布像¹⁾

している。細胞の大きさはおよそ $20\ \mu\text{m}$ 程度である。図9の例では、測定した最も少ない量は $7.5\ \text{amol}$ で、別に用意した検量線から amol レベルで細胞内のTNBSを定量できたと報告されている。種々の検討から、同一TNBS量の細胞群で測定結果がばらついてるのは、TNBS取り込み量が細胞によりまちまちであるためであると報告している。

このように、熱レンズ顕微鏡で細胞内化学種の超微量定量分析ができることが示された。光熱変換分光法は本質的に光散乱の影響を受けにくいので、熱レンズ顕微鏡による測定でも細胞膜や細胞質などの光散乱による外乱を受けにくく、顕微蛍光分光法などに比較してもより定量性の良い測定が可能となろう。

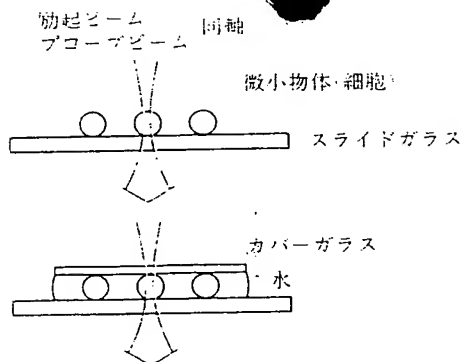


図8 スライドガラス下の培養液中に存在する細胞の *in-vitro* 熱レンズ測定⁸⁾

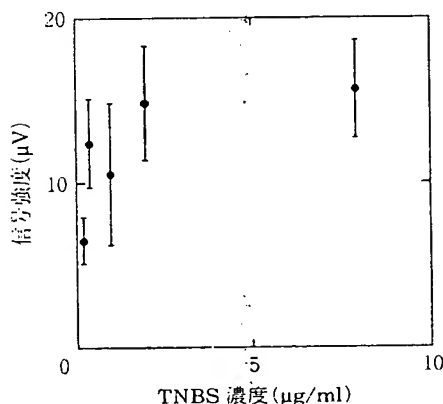


図9 マウス培養細胞中の TNBS の検量線⁸⁾

5 展 望

以上のように熱レンズ顕微鏡は空間分解能に優れるだけでなく、定量性の良い分析顕微鏡としての応用や細胞や組織などの *in-vitro*, *in-vivo* 測定に展開されていくことが期待される。また、優れた空間分解能と定量性を利用すれば、例えば平板ゲル電気泳動法を小型化し、分析時間や試料量を大幅に低減することも可能となる。実際に筆者らは1から2 cm程度のゲルを用いて、100から2000 bp程度のDNA断片を分離検出することに成功している。

また、熱レンズ顕微鏡は光熱変換分光法の利点や特長を受け継いでいるので、熱拡散率や比熱などの熱物性物理量の分布測定や超高速時間分解測定などにも展開されよう。これは材料開発や物理化学研究に極めて有効な手法となるであろう。

一方、液相微小空間の分光分析ができることから、最近盛んに研究され始めている様々な分析システムのマイクロ化や集積化の動向に対して有力な検出法となることも期待できる。例えば、ガラス基板に描画した幅数10~100 μm程度のマイクロチャンネル内に導入したnlレベルの超微量液体に対しても、熱レンズ顕微鏡によるzmolレベルの定量分析が可能であり、更には可算個から単一分子の定量的検出にも期待できることが示されてきた¹⁰⁾。熱レンズ顕微鏡の応用は究極の小型分析システムの実現や、レーザー蛍光法が唯一であった単一分子化学の研究に大きな展開を与えるだろう。単一分子による光熱変換効果は、熱レンズ効果とは異なる新たな効果として光熱変換分光の観点からも興味深い。これらについては別の機会に紹介したい。

文 献

- 1) 澤田嗣郎編: "光熱変換分光法とその応用", (1997), (学会出版センター).
- 2) M. Harada, K. Iwamoto, T. Kitamori, T. Sawada: *Anal. Chem.*, **65**, 2938 (1993).
- 3) D. S. Burgi, N. J. Dovichi: *Appl. Opt.*, **26**, 4665 (1987).
- 4) P. K. Kuo: *Appl. Opt.*, **29**, 5326 (1990).
- 5) H. Saito, M. Irikura, M. Haraguchi, M. Fukui: *Appl. Opt.*, **31**, 2047 (1992).
- 6) 原田 明, 北森武彦, 澤田嗣郎: 色材, **68**, 606 (1995).
- 7) H. Kimura, M. Mukaida, T. Kitamori, T. Sawada: *Anal. Sci.*, **13**, 729 (1997).
- 8) M. Harada, M. Shibata, T. Kitamori, T. Sawada: *Anal. Chim. Acta*, **299**, 343 (1995).
- 9) J. Zheng, T. Odake, T. Kitamori, T. Sawada: *Anal. Chem.*, submitted.
- 10) T. Kitamori, T. Sawada: Abstracts of IV International Symposium, Chemistry Forum '98 (Warsaw), p. 127 (1998).



北森武彦 (Takehiko KITAMORI)
 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)。東京大学教養学部基礎科学科卒。工学博士。《現在の研究テーマ》化学実験の集積化と液相微小空間化学、単一分子分光法。《主な著書》“基礎化学シリーズ”(丸善)。《趣味》ピアノ、スポーツドライビング。